



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## **Artigo de Revisão Bibliográfica**

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

---

# **Microbiologia Forense e Estimativa do Intervalo *Postmortem***

---

Patrícia Pereira Novo

Orientadora: Inês Caldas

Coorientadora: Benedita Sampaio Maia

**Porto, 2017**

**Autora:**

Nome: Patrícia Pereira Novo

Número de aluno: 201200168

E-mail: mimd12016@fmd.up.pt ou pat\_pereir@hotmail.com

**Orientadora:**

Nome completo: Inês Alexandra Costa Morais Caldas

Grau académico: Doutoramento

Título profissional: Professora Auxiliar FMDUP

**Coorientadora:**

Nome completo: Maria Benedita Almeida Garrett de  
Sampaio Maia Marques

Grau académico: Doutoramento

Título profissional: Professora Auxiliar FMDUP

**Área científica:**

Medicina Dentária Forense

# Agradecimentos

Quero agradecer à minha família, por toda a ajuda e apoio, por acreditarem em mim e por valorizarem sempre as minhas capacidades.

Às minhas meninas da Marinha Grande, pelos longos anos de amizade e por todas as memórias que criámos juntas.

Aos meus amigos da minha segunda casa, o Porto, por termos feito esta caminhada juntos e por se terem tornado um pilar importante na minha vida.

E, acima de tudo, agradeço às professoras Inês Caldas e Benedita Sampaio Maia, por estarem sempre disponíveis para me ajudar e auxiliar na elaboração desta monografia. Muito obrigada!

# Abreviaturas

IPM – Intervalo *Postmortem*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

HMP - *Human Microbiome Project*

HPMP - *Human Postmortem Microbiome Project*

ADD - *Accumulated degree days*

CDI – *cadaver decomposition Island*

OTU – *operational taxonomic unit*

ARN – Ácido ribonucleico

HFA - *human flora associated*

ATP - adenosina trifosfato

ISPM - intervalo de submersão *postmortem*

# Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	8
Desenvolvimento.....	9
O Microbioma Humano .....	9
A decomposição de um cadáver.....	10
Microbioma Humano <i>Postmortem</i> .....	16
O Tanatomiobioma e as Comunidades Epinecróticas .....	17
Micologia Forense .....	25
Estimativa do Intervalo de Submersão <i>Postmortem</i> .....	26
Conclusão .....	28
Referências Bibliográficas.....	29
Anexos .....	32
Anexo 1.....	33
Anexo 2.....	35
Anexo 3.....	37

# Resumo

**Introdução:** Na atualidade, revela-se cada vez mais necessário a existência de métodos objetivos e precisos de avaliação e estimativa do intervalo *postmortem*, para uso em contexto médico-legal. A estimativa do intervalo *postmortem* depende de diversos fatores, nomeadamente a causa de morte, o local onde o corpo permaneceu *postmortem*, bem como as condições ambientais que vigoram durante a decomposição. A sucessão *postmortem* das comunidades microbianas tem sido sugerida como um possível método para estimar o intervalo *postmortem*.

**Objetivos:** Este artigo de revisão bibliográfica tem como objetivos explorar as novas aplicações da microbiologia forense na estimativa do intervalo *postmortem*, bem como esclarecer o conhecimento atual da dinâmica da atividade microbiana em cadáveres em várias fases de decomposição.

**Material e Métodos:** Foi realizada uma pesquisa bibliográfica através da base de dados *Pubmed*, e a pesquisa foi restringida a artigos publicados nos últimos 10 anos, no idioma inglês, tendo sido incluídos 44 artigos no total.

**Desenvolvimento:** O microbioma humano desempenha um papel fundamental na decomposição dos tecidos *postmortem*. Independentemente do número de fases da classificação da decomposição, esta segue uma sequência semelhante, estabelecida com base em fenómenos físicos observáveis e no padrão de atividade de insetos. Através de técnicas inovadoras de sequenciação de nova geração, as comunidades microbianas presentes ao longo do processo de decomposição de mamíferos estão a ser exploradas, a partir de modelos animais ou de restos humanos, em ambientes aquáticos e terrestres. Em estudos prévios, foi observado que as comunidades microbianas *postmortem* de carcaças em decomposição são dominadas pelos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, e Proteobacteria. Adicionalmente, os fungos parecem também ter um papel promissor na estimação do IPM.

**Conclusões:** A análise da sucessão de comunidades microbianas, no sentido de investigar a progressão da decomposição de um cadáver, pode contornar muitas das limitações de outros métodos de determinação do intervalo *postmortem*, ou serem importantes dados complementares.

**Palavras-chave:** Intervalo *postmortem*, microbioma humano, microbiologia forense, tanatomiobioma, comunidades epinecróticas, micologia forense

# Abstract

**Introduction:** Nowadays, there is an increasing need for objective and accurate methods for evaluation and estimation of the postmortem interval, for use in a medico-legal context. The estimation of the postmortem interval depends on several factors, namely the cause of death, the place where the body remained postmortem, as well as the environmental conditions that prevail during decomposition. The postmortem succession of microbial communities has been suggested as a possible method for estimating the postmortem interval.

**Objectives:** This article aims to explore the new applications of forensic microbiology in the estimation of the postmortem interval, as well as to clarify the current knowledge of the dynamics of microbial activity in cadavers in various stages of decomposition.

**Material and Methods:** A bibliographic search was performed through the Pubmed database, and the research was restricted to articles published in the last 10 years in the English language, and 44 articles were selected in total.

**Development:** The human microbiome plays a key role in the decomposition of postmortem tissues. Irrespective of the number of phases of the decomposition classification, it follows a similar succession, established based on observable physical phenomena and the pattern of insect activity. Through new generation sequencing techniques, the microbial communities present throughout the mammal decomposition process are being explored, from animal models or from human remains, in aquatic and terrestrial environments. In previous studies, it was observed that the postmortem microbial communities of decaying carcasses are dominated by the phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria. In addition, fungi may also be important determinants to estimate the postmortem interval.

**Conclusions:** Analysis of the succession of microbial communities in order to investigate the progression of decomposition of a cadaver can overcome many of the limitations of other methods of determining the postmortem interval, or it can be important complementary data.

**Key-words:** Postmortem interval, human microbiome, forensic microbiology, thanatomicrobiome, epinecrotic communities, forensic mycology.

# Introdução

No âmbito das ciências forenses, a estimativa do tempo que decorreu desde a morte de um indivíduo (intervalo *postmortem*, ou IPM) é significativamente relevante, pois facilita a identificação de vítimas e suspeitos, a aceitação ou rejeição de álbis, ou a emissão de atestados de óbito (1). Assim, é cada vez mais necessário a existência de métodos objetivos de avaliação do IPM, para fornecer estimativas mais precisas, para uso em contexto médico-legal (1).

As várias abordagens que existem atualmente para avaliar o IPM incluem: análise física (algor mortis, livor mortis), físico-química (rigor mortis), bioquímica (concentração eletrolítica, atividade enzimática), microbiológica (estudo da decomposição), entomológica e botânica (2).

No entanto, o IPM é difícil de estabelecer porque temos uma compreensão relativamente pobre sobre a decomposição do cadáver. A estimativa do IPM depende de diversos fatores, nomeadamente a causa de morte, o local onde o corpo permaneceu *postmortem*, bem como as condições ambientais durante a decomposição (3, 4).

De entre os fatores que influenciam a taxa de decomposição de um cadáver, citam-se a temperatura, a humidade, o pH e a pressão parcial de oxigénio. A temperatura é influenciada pelas estações do ano, altitude, latitude, profundidade de inumação, presença de água, movimento de ar, vegetação, existência de vestuário, etc (5).

O microbioma humano, ou seja, as diversas comunidades microbianas que habitam o corpo humano, desempenha um papel fundamental na decomposição dos tecidos *postmortem* (1). A sucessão *postmortem* das comunidades microbianas tem sido sugerida como um possível método para estimar o IPM, para análises forenses (1).

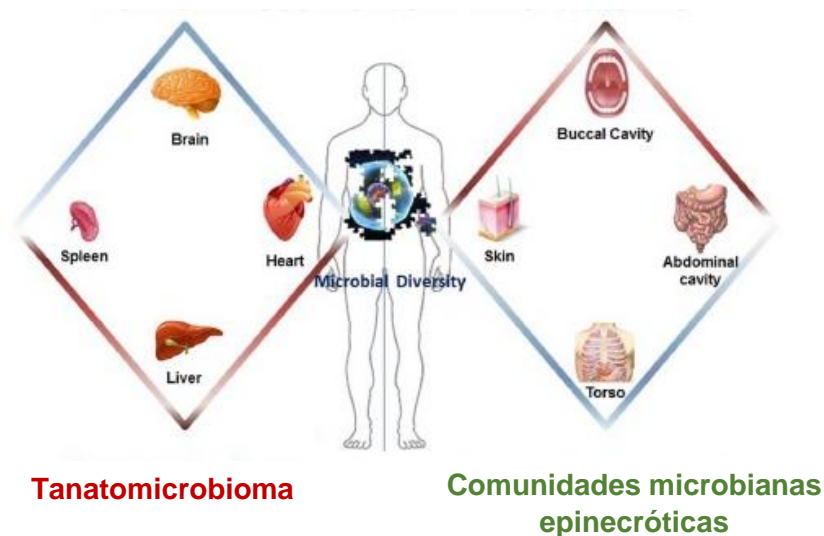
Estudos sobre o microbioma humano revelaram que 75 a 90% das células no corpo, antes da morte, são microbianas (6). Após a morte, a putrefação ocorre, sendo um processo complexo que abrange a degradação química e autólise das células. A decomposição também envolve a libertação do conteúdo dos intestinos, devido a enzimas, sob os efeitos de fatores abióticos e bióticos.



Esses fatores, provavelmente, têm efeitos previsíveis nas comunidades microbianas *postmortem*, e podem promover o desenvolvimento de estudos forenses (6).

Contrariamente ao que se acreditava, os órgãos internos humanos não são completamente estéreis em hospedeiros vivos (6). Fredette, em 1916, descobriu organismos cultiváveis em 35% dos casos de disseção anatómica *postmortem*, e verificou que a proporção de casos positivos aumentou à medida que o IPM era superior (6). Portanto, as bactérias que se encontram nos órgãos internos de cadáveres estão, possivelmente, associadas à decomposição (6).

O conhecimento atual acerca do microbioma humano, bem como as suas diversas aplicações, tem o potencial de transformar o ramo da microbiologia forense (7). O microbioma humano *postmortem* inclui o tanatomiobioma (*thanatos*, do grego para “morte”, microbioma de órgãos internos de cadáveres) e as comunidades microbianas epinecróticas (comunidades microbianas que residem no sujeito, ou ao longo da superfície dos restos em decomposição) (7).



**Figura 1 – Microbioma Humano Postmortem:** inclui o tanatomiobioma (órgãos internos de cadáveres) e as comunidades microbianas epinecróticas (pele, cavidade oral, tronco, cavidade abdominal). Fonte: adaptado (sem autorização), de Javan *et al.* (2016).

Os mecanismos de decomposição mediados por bactérias começam imediatamente após a morte. Pouco se sabe sobre a microbiologia *postmortem* em cadáveres, particularmente a estrutura da comunidade microbiana que reside dentro do cadáver, e a dinâmica dessas comunidades durante a decomposição. Trabalhos recentes sugerem que estas comunidades bacterianas sofrem alterações sucessivas ao longo do intervalo *postmortem*, havendo modificações a nível de grupos taxonómicos e composição relativa (8).

A sequenciação de nova geração do 16S rADN (ADN ribossómico) tem desempenhado um papel fundamental na identificação precisa de isolados bacterianos e na descoberta de bactérias em laboratórios de microbiologia clínica (9). Para a identificação bacteriana, a sequenciação do gene 16S rADN é particularmente importante, no caso de bactérias com perfis fenotípicos incomuns, bactérias raras ou de crescimento lento (9).

Os métodos tafonómicos forenses que existem atualmente carecem de especificidade na estimativa do IPM, no período após a decomposição ativa. Desta forma, encontram-se em investigação novos métodos (como o uso da concentração de citrato no osso) (10). Contudo, é importante investigar a aplicabilidade desses métodos em diferentes contextos ambientais (10).

Recentemente, foi demonstrado em modelos experimentais de suínos e roedores que o microbioma do cadáver muda significativamente no decorrer do processo de decomposição, verificando-se uma sucessão ecológica das diferentes comunidades microbianas (11). Os fluidos cadavéricos que são libertados na decomposição modificam o ambiente do solo e, assim, influenciam os microrganismos que aí se encontram, o que pode ser uma ferramenta para estimar o IPM (11, 12)

Atualmente, o cálculo do IPM mínimo depende principalmente de evidência médica e entomológica, sendo que após 24 a 48 horas *postmortem* são necessários métodos adicionais para estimar o IPM (12).

Nas horas imediatas após a morte, a tríade mortis (algor, rigor e livor mortis), a análise de mudanças no humor vítreo e de componentes de tecidos moles podem ser usados para estimar o IPM, mas existe um erro considerável associado a estes métodos (1). Para intervalos de tempo intermédios (dias a semanas), a entomologia forense oferece estimativas do IPM mínimo com base na colonização de insetos, mas este método limita-se a casos em que os insetos

têm acesso ao cadáver, e pode ser impreciso se houver atrasos na oviposição (1, 13). Tendo em conta a sua atividade e distribuição geográfica, Diptera é a ordem de insetos mais utilizada nas análises forenses, e o conhecimento de fatores que inibam ou que estimulem a sua colonização é, desta forma, um requisito necessário para a análise entomológica (14).

Dadas as diferenças climáticas entre localizações geográficas distintas, a compreensão da biologia e ecologia de espécies de insetos necrófagos é necessária, em alguns casos, para estimar o IPM. Após as 4-6 semanas *postmortem*, as estimativas entomológicas do IPM tornam-se menos fidedignas, e portanto novas ferramentas forenses, complementares às existentes, são necessárias (em particular nos casos de IPM mais longo) (4, 12).

A análise de fluidos, especificamente de ácidos gordos voláteis, ao redor e sob um corpo em decomposição, é uma abordagem viável, juntamente com a caracterização química ou biológica dos solos, embora não seja útil se o corpo tiver sido movido do local original de decomposição (1). Tem sido proposto que os constituintes inorgânicos do osso poderiam indicar estimativas do IPM a longo prazo (semanas a meses) (1).

Embora a observação das mudanças macroscópicas tenha sido a base da deteção do tempo de morte, a aplicação de técnicas histológicas tem vindo a revelar-se uma ferramenta cada vez mais valiosa na pesquisa forense (15). Na investigação de Yadav *et al.* (2015), os autores concluíram que as alterações histológicas nos tecidos gengivais podem ser úteis na estimativa do tempo de morte, no período *postmortem* inicial (primeiras 24 horas) (15). No entanto, são necessários mais estudos em larga escala, em intervalos de tempo variáveis no mesmo indivíduo morto, de modo a permitir padronizar o procedimento e fornecer resultados mais precisos (2).

Para os investigadores, através da utilização de uma combinação de vários métodos, consegue-se uma melhoria na estimativa do IPM. Por vezes, os fatores ambientais (como a temperatura, a humidade, e a pressão parcial de oxigénio) podem ser integrados nesses métodos, para prever a variabilidade dentro de uma região climática. Quantos mais parâmetros forem incluídos no cálculo, mais fiável será a estimativa do IPM (1).

A determinação de comunidades microbianas, no sentido de investigar a progressão da decomposição de um cadáver, pode contornar muitas das

limitações de outros métodos de determinação do IPM, pois as bactérias são ubíquas no ambiente e no homem, e podem ser identificadas e quantificadas com elevada sensibilidade e exatidão (3).

Deste modo, este artigo de revisão bibliográfica tem como objetivos explorar as novas aplicações da microbiologia forense na estimativa do IPM, bem como esclarecer o conhecimento atual da dinâmica da atividade microbiana em cadáveres em vários estádios de decomposição.

## Material e Métodos

Para a realização desta revisão bibliográfica, foi realizada uma pesquisa bibliográfica através da base de dados *Pubmed*, com recurso às palavras-chave *“forensic microbiology and postmortem interval” OR “forensic microbiology postmortem” OR “thanatomicrobiome”*, publicados até à data 6/02/2017. Os critérios de seleção das publicações basearam-se no ano de publicação, pelo que a pesquisa foi restringida a artigos publicados nos últimos 10 anos, no idioma inglês. Foram encontrados 204 artigos, que foram analisados após a leitura dos mesmos, e consoante a sua relevância para o tema, foram selecionados 25 artigos. Utilizaram-se mais 19 artigos que constavam da bibliografia dos artigos previamente selecionados, pelo que foram utilizados 44 artigos no total.

# Desenvolvimento

## 1) O Microbioma Humano

Diversos estudos do microbioma humano revelaram que indivíduos saudáveis diferem notavelmente nas comunidades microbianas que habitam locais distintos no hospedeiro, como o intestino, a pele e a vagina (16). Grande parte dessa diversidade permanece inexplicada, embora a dieta, o ambiente, a genética do hospedeiro e a exposição microbiana precoce tenham sido fatores associados a essa diversidade (16). Consequentemente, para caracterizar a ecologia das comunidades microbianas associadas aos seres humanos, o Projeto do Microbioma Humano (HMP, *Human Microbiome Project*) analisou o maior conjunto de habitats distintos no corpo humano, com relevância clínica, até à atualidade (16).

De acordo com o Projeto do Microbioma Humano, 90% das células de um corpo adulto saudável são microrganismos (17). Os resultados obtidos estabelecem as configurações estruturais e funcionais normais nas comunidades microbianas de uma população saudável, possibilitando a caracterização da epidemiologia e ecologia do microbioma humano (16).

O microbioma humano desempenha um papel fundamental na decomposição dos tecidos *postmortem* (1). A maioria dos microrganismos comensais reside no intestino grosso, e esta comunidade é constituída, na sua maioria, por Bacteroidetes (ex, *Bacteroides spp.*) e Firmicutes (ex, *Lactobacillus spp.*), com populações menores de Proteobacteria (ex, *Escherichia spp.*) e Actinobacteria (ex, *Bifidobacterium spp.*) (1). Segundo Palmiere *et al.* (2016), a microbiota intestinal humana é composta por 300–500 espécies diferentes de bactérias (18).

Apesar da existência de variações nas proporções relativas destas espécies entre indivíduos, a composição do microbioma intestinal é distinta de outras comunidades microbianas, como as presentes no solo ou na água (1). A sucessão de microrganismos intestinais foi analisada em sujeitos vivos, e é relativamente estável ao longo do tempo (1).

O *Human Postmortem Microbiome Project* (HPMP) - Projeto do Microbioma Humano *Postmortem* - realiza esforços para recolha de dados referentes à abundância e variedade dos microrganismos envolvidos na decomposição humana (6, 7). O papel dos investigadores deste projeto consiste em fornecer informação relativa à colonização microbiana interna (tanatomiobioma) e externa (necrobioma, isto é, microrganismos associados à decomposição) (7). O necrobioma engloba a comunidade de microrganismos, procariotas e eucariotas, associada à decomposição de biomassa, isto é, de restos cadavéricos animais e humanos (19).

O principal objetivo deste projeto é melhorar a compreensão neste âmbito e auxiliar a resolução de questões relativas à forma de morte e estimativa do intervalo *postmortem* (7). No futuro, este projeto promoverá esforços para validar e padronizar protocolos para aplicação em investigações forenses (7).

## **2) A decomposição de um cadáver**

### **a) Alterações celulares**

Após a morte, o ambiente hospedeiro sofre mudanças devido à decomposição das células, e consequente libertação de componentes celulares para os tecidos circundantes. Existem vários eventos que ocorrem após a morte de uma pessoa que levam à reprodução de certos tipos de células microbianas, e à quiescência ou morte de outras células (7).

As células humanas tornam-se hipóxicas, devido à cessação da circulação sanguínea, e esta falta de oxigénio desencadeia a libertação de fatores intracelulares que causam a degradação de organelos celulares, por enzimas autolíticas (17). Estas enzimas causam a lise das membranas celulares, libertando constituintes celulares para os tecidos circundantes, ricos em nutrientes, tais como hidratos de carbono, aminoácidos, lípidos, minerais e água (17). Como as bactérias metabolizam estes constituintes para o seu crescimento, verifica-se aumento da abundância microbiana (17).

A diminuição de oxigénio cria um ambiente ideal para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, como espécies dos géneros *Clostridium* e *Bacteroides*, originários do trato gastrointestinal e respiratório (17).

Estes microrganismos transformam os hidratos de carbono, lípidos e proteínas em ácidos orgânicos e gases, tais como H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub>, metano, amoníaco, dióxido de enxofre e hidrogénio (17, 20). A acumulação de gás resultante cria pressão, o que faz com que o cadáver inche e os fluidos sejam expelidos do corpo (21).

Os produtos metabólicos das bactérias intestinais causam enfisema, mesmo em condições anaeróbicas, e este facto influencia a composição das comunidades microbianas, propiciando a libertação de outros produtos metabólicos voláteis (22). Consequentemente, os produtos voláteis emitidos durante a decomposição podem sofrer variações, existindo estudos que investigam a existência de um padrão de emissão (22). Paczkowski *et al.* (2011) defendem que este padrão de produtos voláteis, dependente do tempo, poderá ter aplicabilidade na área forense (22).

#### b) Fases da decomposição cadavérica

Há diversas classificações das fases de decomposição de um cadáver, estabelecidas com base em fenómenos físicos observáveis e em padrões de atividade de insetos (19). Independentemente do número de fases da classificação, a decomposição segue uma sequência semelhante, desde o estadio fresco ao completamente esqueletizado (19).

Segundo Finley *et al.* (2015), existem cinco estadios de decomposição de vertebrados: fresco, período enfisematoso, período de decomposição ativa, decomposição avançada e restos esqueletizados secos (23). Os estadios iniciais da decomposição são marcados pelo início da desidratação do cadáver e pela descoloração dos tecidos (21). O período fresco inicia-se com a morte do indivíduo, e prolonga-se até o cadáver começar a aumentar substancialmente de volume devido à acumulação de gases, o que marca o início da fase enfisematosa (23). O estadio enfisematoso ocorre devido à atividade metabólica microbiana, principalmente a comunidade entérica, cujos produtos gasosos fazem aumentar o volume do corpo (19, 23).

Eventualmente, o enfisema resultante da putrefação e a atividade de larvas causam rutura da pele, o que expõe mais o cadáver e permite a entrada



de oxigênio, assim como aumenta a área de superfície para desenvolvimento de insetos e microrganismos (20).

Estes acontecimentos marcam o início do período de decomposição ativa, que progride rapidamente e onde há aumento da intervenção de insetos (23). Durante a deterioração precoce, bactérias intrínsecas começam a digerir os intestinos de dentro para fora, eventualmente digerindo os tecidos circundantes (21). A decomposição avançada é caracterizada por um aumento da atividade entomológica (23). Na fase final, permanecem apenas ossos, pele seca e cabelo, correspondendo ao período de restos esqueletizados secos (23). No entanto, a mumificação (preservação dos tecidos) também é um fenômeno que pode ocorrer (21).

À medida que o tempo progride, e, nomeadamente, na fase esqueletizada da decomposição, a capacidade de estimar o intervalo *postmortem* diminui significativamente. (24)

É importante ter em consideração que estes estádios baseiam-se, maioritariamente, na atividade de certas espécies de insetos, e que a decomposição é um processo contínuo, isto é, estabelecer o início ou o fim de cada fase pode ser subjetivo. Por este motivo, as comunidades microbianas podem ser um método mais preciso para estimar o IPM (23).

Ao determinar o tempo decorrido desde a morte, os investigadores forenses podem concentrar-se na progressão dos estádios de decomposição, em função da temperatura, para ajudar a estabelecer intervalos de tempo máximos e mínimos para a decomposição (21).

### c) Fatores que influenciam a decomposição

Existem diversos fatores que influenciam a decomposição de um cadáver e que afetam a velocidade a que o processo ocorre. De entre esses fatores, cita-se a presença ou ausência de vestuário, existência de ferimentos no corpo, atividade de animais carnívoros, atividade de insetos, doenças do indivíduo, percentagem de massa gorda do corpo, presença de vegetação nas regiões circundantes, presença de agentes químicos, entre outros (5, 25).

O progresso da decomposição é altamente influenciado pela temperatura. O parâmetro graus-dias-acumulados, ou o “*Accumulated degree days*” (ADDs: a soma da temperatura diária média) é um parâmetro utilizado para compensar as diferenças de temperatura (20). Por exemplo, um estadio de decomposição avançada de um cadáver humano com 68kg ocorre em 400 ADD, enquanto que a fase de restos esqueletizados está associada a 1285 ADD. Assim, e de uma forma geral, com temperaturas médias de 25°C, a fase de decomposição avançada estabelece-se ao fim de 16 dias, enquanto que no inverno, com médias de temperatura de 5°C, esse estadio só seria alcançado depois de 80 dias (20).

O processo de decomposição compreende uma associação entre fatores bióticos (isto é, a individualidade do cadáver, bactérias intrínsecas e extrínsecas ou insetos) e fatores abióticos (como o clima e a humidade) e, portanto, depende de um cenário ecológico específico (21). Qualquer alteração no ecossistema pode influenciar a decomposição, e, deste modo, é fundamental para as ciências forenses que a interação desses fatores seja compreendida (21).

Em alguns casos, a presença de adipocera (cera cadavérica) pode atrasar a decomposição dos tecidos subjacentes, o que significa que nestas circunstâncias é mais difícil estimar o IPM (26).

#### d) Ecologia do solo

Os materiais cadavéricos são rapidamente integrados no solo, o que resulta na formação de locais altamente férteis, denominados ilhas de decomposição cadavérica (CDI – *cadaver decomposition island*), que contribuem para a biodiversidade do ambiente (20).

As comunidades microbianas sob um cadáver em decomposição sofrem mudanças bioquímicas significativas, como resultado de movimentos de fluidos e nutrientes. A sucessão de microrganismos do solo tem o potencial de ser utilizada em investigações criminais para estimativa do IPM ou para identificação de locais de enterro clandestinos (27, 28).

Foi estabelecido que, durante a primeira fase de decomposição, os organismos aeróbios predominam, esgotando os recursos de oxigénio e, assim,

estabelecendo condições para que os organismos anaeróbios prevaleçam na fase seguinte. É durante esta fase que a maioria dos microrganismos do corpo se transferem para o solo, devido à abertura de cavidades nos tecidos (29).

Benninger *et al.* (2008) investigaram a dinâmica de compostos à base de carbono, azoto e fósforo no solo sob cadáveres de porcos (*Sus scrofa*), e a decomposição foi avaliada através das características físicas do cadáver, pH do solo, teor de humidade do solo e concentração total de carbono, azoto e fósforo (30). Nos estadios iniciais de decomposição, foi observado um aumento na concentração de carbono, azoto e fósforo e um fluxo localizado de biomassa microbiana (30).

Nas fases finais da decomposição, a perda de material cadavérico é mais lenta, e observa-se um aumento do pH do solo e concentração de nutrientes (28) (29). Embora nos estadios finais haja menos transferência de fluidos cadavéricos para o solo, estudos demonstraram que os microrganismos podem permanecer neste habitat durante meses, ou até anos, devido à elevada concentração de carbono (28).

O estudo de Benninger *et al.* (2008) fornece mais evidências de que um método baseado na análise do solo tem o potencial de atuar como uma ferramenta para estimar intervalos *postmortem* mais extensos (superiores a 30 dias) (30).

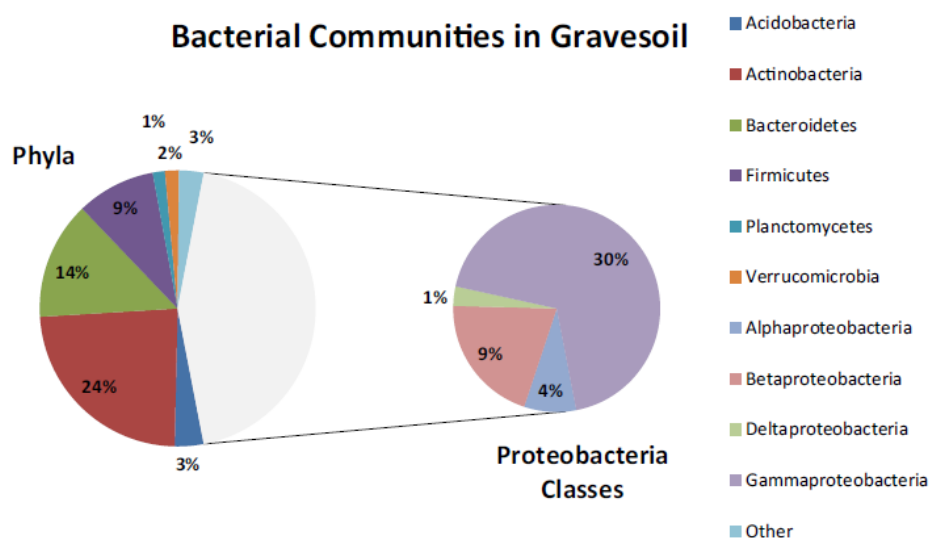
Estudos no âmbito da ecologia do solo, nomeadamente do ciclo de carbono e nutrientes, formação de matéria orgânica e da biodiversidade do ecossistema, podem trazer benefícios na área das ciências forenses (20).

Cobaugh *et al.* (2015) conduziram uma investigação com o objetivo de analisar a química do solo sob cadáveres em decomposição, bem como caracterizar a atividade e a estrutura da comunidade microbiana (31). A decomposição resultou em picos de carbono e nutrientes (em particular, amónia) nos diferentes solos analisados (31). Não foram registadas alterações na abundância bacteriana total, porém foram observadas mudanças distintas na composição e função da comunidade (31). Durante a decomposição ativa (7 a 12 dias *postmortem*), as taxas de respiração e de produção de biomassa foram altas: a comunidade microbiana foi dominada por Proteobactérias (aumento de 15,0 a 26,1% de abundância relativa) e Firmicutes (aumentado de 1,0 a 29,0%), com abundância reduzida de Acidobacteria (diminuiu de 30,4 para 9,8%) (31).

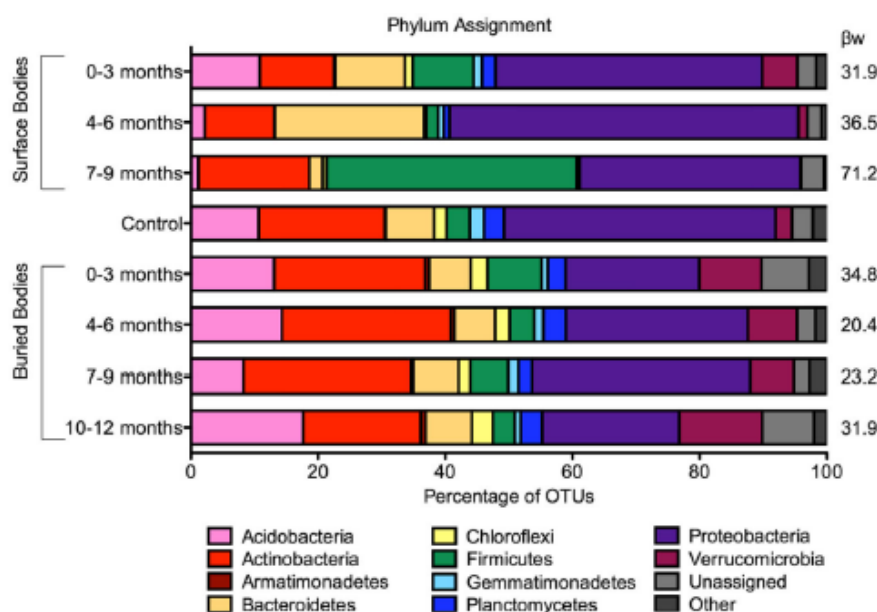
Quando a velocidade de decomposição diminuiu (cerca de 10-23 dias *postmortem*), a taxa de respiração aumentou, mas as taxas de produção de biomassa diminuíram drasticamente: esta comunidade microbiana, com baixa eficiência de crescimento, era dominada por Firmicutes e outros grupos de anaeróbios (31).

As bactérias associadas ao ser humano, incluindo os *Bacteroides* anaeróbios obrigatórios, foram detetadas no solo, em altas concentrações, até 198 dias após a morte (31). Os resultados do estudo de Cobaugh *et al.* revelaram, deste modo, o padrão de sucessão das comunidades microbianas do solo durante a decomposição (31).

Segundo Metcalf *et al.* (2016), o tipo de solo não constitui um fator dominante no progresso das comunidades bacterianas, e o processo de decomposição é suficientemente reproduzível para fornecer informações em investigações forenses (32).



**Figura 2 – Comunidades bacterianas em solos associados a cadáveres.**  
Abundância relativa de filos bacterianos presentes no solo. Fonte: adaptado (sem autorização) de Finley *et al.*, 2015.



**Figura 3 – Abundância relativa das sequências de genes 16S rARN (OTUs)** obtidas de solos sob cadáveres (“*surface*”) ou sobre cadáveres (“*buried*”). Fonte: adaptado (sem autorização) de Finley *et al.*, 2016.

### 3) Microbioma Humano *Postmortem*

As mudanças taxonómicas das comunidades microbianas durante a decomposição, assim como o subsequente efeito na capacidade metabólica do cadáver e no ambiente circundante, podem ser vistas como uma estratégia por parte dos microrganismos para competir com insetos e animais necrófagos por uma fonte de nutrientes (32).

As mudanças sucessivas que se verificam na comunidade microbiana, tanto estrutural como funcionalmente, refletem a pressão seletiva do *hotspot* biogeoquímico constituído pelo cadáver em decomposição (32). Consequentemente, a sucessão microbiana durante a decomposição aparenta ser, de facto, um processo previsível, com implicações no ciclo biogeoquímico e nas ciências forenses (32).

Os métodos de sequenciação genómica, como a sequenciação de nova geração, permitiram a identificação de comunidades inteiras de bactérias, sem recorrer a métodos dependentes de cultura (24). Através destas técnicas de sequenciação de alto rendimento, as comunidades microbianas presentes ao

longo do processo de decomposição de mamíferos estão a ser exploradas, a partir de modelos animais ou de restos humanos, em ambientes aquáticos e terrestres (24). Estas investigações não têm os fatores limitantes que advêm do uso de métodos de cultura, assim como permitem uma melhor compreensão das semelhanças e variabilidades do microbioma na decomposição dos mamíferos (24). As técnicas dependentes de meios de cultura só permitem a avaliação parcial da comunidade microbiana (33).

Num estudo de Lauber *et al.* (2014), foi feita a caracterização da comunidade microbiana através da sequenciação do gene 16S rARN para bactérias e archaea e do gene 18S rARN para fungos e eucariotas, em três locais corporais de ratinhos, juntamente com a análise do solo subjacente, em intervalos de tempo coincidentes com alterações visíveis na morfologia dos cadáveres (25). Os ratinhos foram divididos em dois grupos, e a decomposição foi feita em dois solos diferentes: um solo intacto e um solo estéril. Os resultados indicaram que a amostra colocada no solo com comunidades microbianas intactas atingiu estádios avançados de decomposição duas a três vezes mais rápido do que aqueles colocados em solo estéril (25).

Contudo, é difícil determinar a origem da comunidade bacteriana responsável pela decomposição (solo ou microrganismos associados ao cadáver), o que sugere a necessidade de realizar mais estudos nesta área (25).

### **3. a) O Tanatomiobioma e as Comunidades Epinecróticas**

O tanatomiobioma (*Thanatos*, grego para “morte”) é um termo relativamente recente, que consiste no estudo dos microrganismos que colonizam os órgãos e orifícios internos após a morte. Avanços científicos recentes revelaram que a maioria dos microrganismos dentro do corpo humano são anaeróbios obrigatórios, nomeadamente *Clostridium spp* (7).

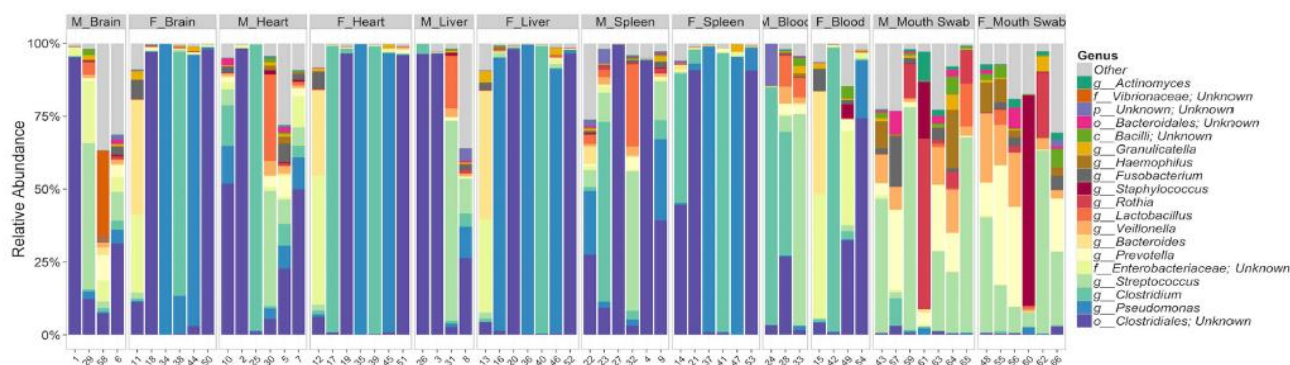
Apesar da abundância dos microrganismos decompositores em cadáveres, há uma escassez de informação sobre os microrganismos específicos envolvidos na decomposição dos órgãos internos humanos (7). Após a morte, o sistema imunológico deixa de atuar, e a proliferação microbiana é facilitada pelo ambiente rico em nutrientes do cadáver (7).

Em estudos prévios, foi observado que as comunidades microbianas *postmortem* de carcaças em decomposição são dominadas pelos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, e Proteobacteria (33). Outra observação recente é que a sucessão de microrganismos *postmortem*, identificados usando métodos de sequenciação de nova geração, é previsível e pode ser usada para estimar o IPM (33).

Segundo Chun *et al.* (2015), os dados atuais mostram que locais diferentes num cadáver parecem hospedar bactérias distintas (33). Na mesma investigação, concluiu-se que as comunidades bacterianas aeróbias, obtidas da pele e da massa de larvas, mudam ao longo do tempo, e estas transformações coincidiram com uma mudança de pH de alcalino para ácido (33). A decomposição das amostras seguiu um padrão típico sigmoide, e as comunidades bacterianas diferiram de local para local e foram dependentes do tempo de morte, embora tenham sido sempre dominadas pelos filos Actinobacteria, Firmicutes, e Proteobacteria (33).

No estudo de Javan *et al.* (2016) foi colocada a hipótese que mudanças no tanatomiobioma de órgãos internos, dependentes do tempo, seriam capazes de estimar o IPM (7). A amostra consistiu em 27 cadáveres humanos de casos criminais, com intervalos *postmortem* entre 3,5 e 240 horas. Os resultados da sequenciação do gene 16S rARN demonstraram mudanças estatisticamente significativas dependentes do tempo, órgão e sexo (7).

O estudo do tanatomiobioma dos órgãos internos e do sangue não é diretamente influenciado pelos mesmos fatores abióticos (como o pH ou a temperatura) e fatores bióticos (isto é, atividade de insetos e de animais necrófagos) que influenciam o necrobioma (7). Além disso, presume-se que o tanatomiobioma de certos órgãos não é imediatamente afetado por microrganismos intestinais, que proliferam rapidamente após a morte humana (7).



**Figura 4 – Abundância relativa de 20 géneros de bactérias mais predominantes, em todas as amostras.** Fonte: adaptado (sem autorização) de Javan *et al.*, 2016.

Estes autores analisaram o microbioma de diversos órgãos internos (cérebro, coração, fígado e baço), cavidades orais e sangue de cadáveres com intervalos *postmortem* entre 3,5 e 240 horas (7). No total, foi realizada a sequenciação de ADN microbiano para 66 espécies dos 27 cadáveres, e as curvas de rarefação demonstraram que quando o número de leituras de sequência aumentou, a riqueza de espécies aumentou consideravelmente com cada amostra (7). Foram também determinadas as abundâncias relativas dos 20 géneros mais predominantes em todas as amostras (Figura 4), e os resultados mostraram que os géneros bacterianos eram semelhantes entre os diferentes órgãos dentro de cada sexo, mas diferiam consoante o sexo (7). No entanto, na cavidade oral, este facto não foi observado, ou seja, foram detetados géneros de bactérias semelhantes em ambos os sexos (7).

Os cadáveres do sexo feminino tiveram uma alta abundância relativa de *Pseudomonas* e *Clostridiales*, enquanto que os do sexo masculino tiveram predominância de *Clostridium*, *Clostridiales* e *Streptococcus* (7). Outro aspeto interessante neste estudo foi a ocorrência de *Pseudomonas* sp. exclusivamente em cadáveres femininos, e a presença de *Rothia* sp. num cadáver masculino (7).

Os autores desta investigação concluíram também que vários géneros, como *Clostridium* e *Prevotella*, possuíam várias espécies que eram potencialmente preditivas de diferentes períodos de decomposição (7). Por exemplo, *C. novyi* foi relativamente mais abundante em IPM mais tardios, e, por



outro lado, uma espécie de *Clostridium* desconhecida foi mais abundante num estadio inicial da decomposição (7).

A cavidade oral revelou o perfil mais distinto, representando a maior quantidade de filos bacterianos, quando comparado com outros órgãos (7). É importante referir que as bactérias Firmicutes, encontradas nas cavidades orais, também foram detetadas em todos os órgãos internos e nas amostras de sangue (7). Os investigadores concluíram que o filo não seria muito preditivo do IPM, mas que os géneros do filo Firmicutes (por exemplo, *Clostridium*, *Bacillus*, *Peptoniphilus*, *Blautia*, *Lactobacillus*), exibiram alterações temporais mais significativas (7).

Sendo assim, à medida que o corpo humano se decompõe, os microrganismos proliferam no sangue, no fígado, no baço, no coração e no cérebro, dependendo do tempo, e foi demonstrado que dentro do mesmo local de amostragem do cadáver, houve variação entre o início e os pontos finais da fase enfisematosa (7). Javan *et al.* produziram um catálogo microbiano do tanatomiobioma, e os resultados deste estudo mostraram que o filo Firmicutes é um potencial biomarcador da comunidade do tanatomiobioma (7).

Estes resultados sugeriram que o conhecimento do número e da abundância dos microrganismos que colonizam cada órgão poderia ser útil para microbiologistas forenses, funcionando como uma nova fonte de dados para estimar o IPM (7).

De acordo com Tuomisto *et al.* (2013), culturas obtidas de líquido pericárdico e do fígado revelaram manter-se estéreis até 5 dias após a morte, e os autores concluíram que estes são os melhores locais para amostra, pois raramente são contaminados e os resultados são verdadeiros positivos (34). Esta investigação também demonstrou que as quantidades relativas de ADN bacteriano intestinal (bifidobactérias, bacteróides, enterobactérias e clostrídios) sofrem um aumento com o tempo (34).

Na investigação de Can *et al.* (2014), foi examinado o tanatomiobioma do baço, fígado, cérebro, coração e sangue de cadáveres humanos, órgãos que, num adulto saudável, são desprovidos de microrganismos (17). Neste estudo, o tanatomiobioma foi muito semelhante entre os tecidos de diferentes órgãos do mesmo cadáver, mas muito diferente entre os cadáveres da amostra, possivelmente devido a diferenças nos tempos decorridos desde a morte e pela

intervenção de fatores ambientais (17). Resultados desta investigação mostraram que os microrganismos anaeróbios obrigatórios do género *Clostridium* foram encontrados em cadáveres com intervalos *postmortem* mais longos, enquanto que os microrganismos anaeróbicos facultativos do género *Lactobacillus* eram mais abundantes em cadáveres com IPM mais curtos (isto é, 29,5 horas versus 240 horas) (7, 17). Este estudo indica que o tanatomiobioma pode ser um biomarcador para estudar as transformações *postmortem* de cadáveres (17).

De acordo com estudos de Hyde *et al.* (2013, 2015), as análises de bactérias presentes na cavidade oral e no reto de cadáveres (com decomposição em ambientes naturais) demonstraram que houve variação entre o estadio inicial de decomposição e a fase enfisematosa (21, 35). Na investigação de Hyde *et al.* de 2015, foi feita a análise e caracterização do microbioma de dois cadáveres humanos, e foi calculada a abundância relativa de filos ao longo do tempo, para todos os locais do corpo analisados (35). Inicialmente, quatro dos cinco locais da pele que constituíram as amostras (bochecha direita, bíceps esquerdo e direito e tronco) foram dominados por bactérias do filo Proteobacteria, que compreendiam entre 60 a mais de 80% da biomassa durante os primeiros 2 dias de decomposição (35). O filo Firmicutes aumentou em abundância nesses locais durante as fases posteriores de decomposição (35). O filo Actinobacteria, embora com menor abundância relativa, também aumentou nas fases posteriores da decomposição, compreendendo aproximadamente 5 a 20% da comunidade bacteriana (35).

Hyde *et al.* (2013) analisaram as mudanças no microbioma de cadáveres, no início e no final da fase enfisematosa, e concluíram que ocorreu uma mudança de bactérias aeróbias para bactérias anaeróbias em todos os locais do corpo analisados, demonstrando também uma variação na estrutura da comunidade entre diferentes cadáveres, entre os locais de amostra e entre os pontos iniciais e finais do estadio enfisematoso (21).

Diversos estudos sobre o microbioma humano demonstraram que as comunidades de microrganismos estão presentes no indivíduo *antemortem* e colonizam o corpo *postmortem* (6).

Na investigação de Heimesaat *et al.* (2012), na qual foram analisadas as mudanças microbianas das comunidades intestinais de roedores, concluiu-se

que a cinética do sobrecrecimento ileal de enterobactérias e enterococos em ratinhos com microbiota humana associada (HFA, *human flora associated*) pode ser utilizada como indicador de funcionalidade intestinal comprometida e para definir mais precisamente o momento da morte (tendo em conta condições ambientais bem definidas) (36).

Heimesaat *et al.* apresentaram um exame cultural e molecular detalhado da dinâmica microbiana no intestino *postmortem*, em condições bem definidas. As análises culturais do conteúdo do cólon luminal revelaram um aumento significativo de *Enterococcus* aeróbios entre 6 e 12 horas após a morte, enquanto que as cargas bacterianas diminuíram ligeiramente entre 3 a 6 horas *postmortem*, devido a diminuições de *Lactobacillus* e *Bacteroides/Prevotella* spp. anaeróbicas obrigatórias. O número decrescente de espécies anaeróbias obrigatórias ao longo do tempo pode ser explicado pela ocorrência de bolsas de gás nos órgãos, inclusive no intestino, durante a autólise, o que por sua vez conduz ao stress oxidativo, privilegiando as populações anaeróbias (36).

A intervenção de comunidades microbianas associadas a insetos pode influenciar a constituição e dinâmica da comunidade microbiana do cadáver, através de mecanismos competitivos, o que pode alterar também os padrões biogeográficos das comunidades microbianas no meio circundante (37).

No estudo de Damann *et al.* (2015), foram avaliadas as comunidades bacterianas associadas à decomposição de osso humano, de IPM conhecido, com o objetivo de ultrapassar as limitações de estimativa do IPM na fase de restos esqueletizados, após a perda da maioria dos tecidos moles (24). Os resultados indicaram que 99.2% de todas as sequências eram referentes a seis filos: Proteobacteria (57.3%), Firmicutes (19.1%), Bacteroidetes (8.4%), Actinobacteria (7.7%), Acidobacteria (5.8%), e Chloroflexi (0.8%), sendo que Proteobacteria foi o filo predominante em todas as amostras (24). Este filo apresenta bastante diversidade, é ubíquo no solo e encontra-se presente no microbioma intestinal humano (24).

Para cada estadio sucessivo de decomposição óssea, verificou-se um aumento na proporção de Alphaproteobacteria, enquanto que a abundância relativa de Gammaproteobacteria diminuiu (24). A seguir ao filo Proteobacteria, os filos Firmicutes e Bacteroidetes constituíram as sequências mais abundantes (24). Estes filos foram previamente identificados como sendo os mais

abundantes no intestino humano. Actinobacteria e Acidobacteria foram mais prevalentes na fase de restos esqueletizados secos do que nos dois primeiros estadios (24).

Por conseguinte, a sucessão taxonómica baseada na abundância relativa de filos bacterianos específicos pode mostrar-se útil na estimativa do IPM de restos esqueletizados. Por exemplo, a amostra de restos parcialmente esqueletizados (grupo A), com IPM entre 27-284 dias, manifestou a maior proporção de Firmicutes em comparação com as outras fases de decomposição (24).

O filo Bacteroidetes atingiu maior abundância relativa na fase de esqueletização completa (fase B), que inclui IPM de 292–369 dias. O grupo de restos esqueletizados secos (grupo C), com IPM entre 554–1692 dias, registou maior abundância relativa de microrganismos do filo Actinobacteria (24).

Relativamente às famílias de bactérias, e em concordância com os filos, as mais abundantes nas amostras dos restos esqueletizados incluíram Pseudomonadaceae, Clostridiaceae, Tissierellaceae, Caulobacteraceae, e Sphingobacteriaceae, enquanto que nas amostras do solo existiu predominância das famílias Hyphomicrobiaceae, Koribacteraceae, Solibacteraceae, e Flavobacteriaceae (24). A riqueza bacteriana presente nos restos esqueletizados aumentou com o avançar do tempo, tornando-se mais semelhante às comunidades presentes no solo (24).

O microbioma de restos esqueléticos em decomposição, com IPM conhecido, demonstrou que as proporções dos grupos de bactérias sofrem alterações à medida que o cadáver avança na decomposição (desde um estadio de restos parcialmente esqueletizados até uma fase de restos esqueletizados secos) (24).

Nas amostras parcialmente esqueletizadas foi detetada a presença de bactérias frequentemente associadas ao microbioma intestinal, enquanto que no grupo de restos esqueletizados secos foram identificadas, maioritariamente, bactérias associadas ao solo, facto que evidencia a intervenção do fator ambiental (24).

Uma investigação de Liu *et al.* (2009) sugere um método de estimativa do IPM através da quantificação de ATP (adenosina trifosfato) microbiano presente nos músculos e órgãos internos de cadáveres (38). Foi observado um aumento

da concentração de ATP microbiano à medida que o tempo avançou, sendo que, 7 dias após a morte, se identificou um pico de ATP microbiano presente no músculo, tendo aumentado novamente ao décimo dia. Por outro lado, o pico de concentração de ATP microbiano presente nos órgãos internos foi detetado aos 8 dias após a morte (38).

Num estudo de Pechal *et al.* de 2014, foi feita a deteção de padrões de abundância da comunidade bacteriana ao longo da decomposição, nomeadamente da pele e cavidade oral, através de técnicas de metagenómica (19). Assim, foi possível identificar grupos bacterianos importantes para estimar o “tempo fisiológico”, uma medida de tempo-temperatura que é proporcional ao IPM (19). Houve diferenças significativas na estrutura da comunidade bacteriana no decorrer do processo de decomposição, tanto a nível do filo como de famílias bacterianas (19). Proteobacteria e Firmicutes foram os filos dominantes, e verificou-se um decréscimo de Proteobacteria nos estádios finais da decomposição, predominando o filo Firmicutes (19).

Pechal *et al.* (2014) concluíram que a utilização da sucessão de filos das comunidades epinecróticas era útil para distinguir intervalos *postmortem* de dias, enquanto que através das famílias bacterianas seria possível estimar a variação do tempo fisiológico, que se revela uma escala temporal mais precisa (19). Os mesmos investigadores descobriram que as comunidades bacterianas epinecróticas sofriam mudanças logo no primeiro dia de decomposição, o que se revela útil nos casos em que há falta de provas forenses (por exemplo, quando ainda não ocorreu colonização de insetos) (19).

Metcalf *et al.* descobriram que a família Xanthomonadaceae aumentou na pele de cadáver de rato no solo ao longo do tempo, e Pechal *et al.* observaram a família Xanthomonadaceae em pequenas quantidades em cadáveres de suínos, sugerindo que esta família de bactérias é um contribuinte relevante para o progresso da decomposição, independentemente do tipo de hospedeiro (3, 19).

Iancu *et al.* (2015) analisaram o processo de decomposição de três carcaças de suínos, durante um período de 7 meses (inverno e primavera), e averiguaram a sucessão de insetos e de microrganismos consoante as fases de decomposição (13). A estrutura das comunidades bacterianas do reto e da cavidade oral das carcaças foi caracterizada durante os mesmos intervalos de

tempo, por eletroforese em gel de gradiente desnaturante e por sequenciação do gene 16S rARN (13). Relativamente à comunidade de bactérias, 53 grupos pertencentes aos filos Proteobacteria (Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria), Firmicutes e Bacteroidetes foram identificados (13). As mudanças detetadas nas comunidades de insetos e bactérias evidenciam o seu papel complementar no processo de decomposição, sendo ramos que se complementam (13).

### **3. b) Micologia Forense**

A micologia forense é um termo relativamente recente usado para descrever as espécies fúngicas presentes na vizinhança de cadáveres humanos, bem como colónias fúngicas potencialmente úteis para estabelecer o IPM (39).

Foi previamente documentado que os fungos são facilitadores dos processos iniciais da decomposição (37). Os fungos frequentemente encontrados em cadáveres são aqueles que normalmente não são capazes de colonizar tecido vivo (40). No entanto, há pouca informação sobre o papel de determinados fungos na decomposição de cadáveres humanos. Apesar deste facto, os restos mortais enterrados diretamente no solo sofrem ação da humidade, ocorrendo deslizamento da pele e propiciando o desenvolvimento de comunidades fúngicas (40).

Schwarz *et al.* (2015) exploraram o possível uso dos fungos como ferramenta forense, e recolheram amostras de pele com crescimento fúngico macroscopicamente visível, em 23 cadáveres em diferentes fases de decomposição, e identificaram as espécies de fungos através de métodos moleculares (41). As espécies identificadas incluíram *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (41). Segundo estes autores, as colónias de fungos estão interligadas às condições ambientais, bem como ao intervalo *postmortem* (41).

Alguns fungos apenas colonizam ou produzem corpos frutificadores (estruturas reprodutoras) em solos com amoníaco ou compostos azotados, e são denominados fungos de amónia. Na investigação de Tranchida *et al.* (2014), os fungos de amónia e os fungos pós-putrefação que foram detetados fazem parte da mesma sucessão de espécies que ocorre durante o processo de

decomposição natural, sendo os fungos de amónia as primeiras espécies identificáveis nesta sucessão (39). Estes fungos iniciais podem produzir corpos frutificadores durante 1 a 10 meses após a fertilização do solo com compostos azotados, e fazem parte dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (39). Neste estudo, *Dichotomomyces cejpilii* foi a espécie dominante no solo analisado (39).

Os fungos que demonstraram ter mais interesse na estimativa do IPM não são fungos especializados com interesse médico, nem fungos restritos a tecidos humanos mortos, mas sim fungos decompositores capazes de colonizar diretamente as superfícies dos cadáveres (40).

As colónias de fungos associadas a cadáveres humanos podem fornecer indicações do tempo decorrido desde a morte (40). No entanto, a viabilidade de qualquer estimativa dependerá da precisão da identificação do fungo, dos métodos de armazenamento do corpo e da disponibilidade de dados sobre a temperatura e a humidade do local. Existem ainda poucos dados sobre as taxas reais de crescimento em tecidos humanos mortos, especialmente sob diferentes condições ambientais. Portanto, é necessária a existência de mais investigações neste âmbito, simulando os parâmetros ambientais com os quais o cadáver está associado (40).

#### **4) Estimativa do Intervalo de Submersão *Postmortem***

Atualmente, não existem métodos padrão para determinar o intervalo de submersão *postmortem* (ISPM), isto é, o intervalo de tempo durante o qual os restos cadavéricos se encontraram submersos, ou parcialmente submersos, em condições ambientais aquáticas (por exemplo, nos casos que envolvem afogamento ou despojamento do corpo) (42-44).

No estudo de Lang *et al.* (2016), foi investigado o potencial da sucessão de biofilmes como método de estimativa do ISPM (42). Os biofilmes são uma formação ubíqua de comunidades microbianas encontradas em superfícies em ambientes aquáticos (42). Lang *et al.* compararam o desenvolvimento das comunidades epinecróticas (biofilmes em carcaças de *Sus Scrofa domesticus*) e epilíticas (que se desenvolvem nas rochas) em dois ambientes aquáticos, através de análise bacteriana (42). As comunidades epinecróticas foram

significativamente diferentes das comunidades epilíticas, embora os fatores ambientais, associados a cada localização, tenham exercido uma influência significativa na estrutura do biofilme (42). Em todas as comunidades, de ambos os locais analisados, ocorreram mudanças sucessivas ao longo do tempo, o que sugere que esta é uma das características do biofilme (42).

As comunidades epinecróticas sofrem mudanças distintas na primeira e na segunda semanas pós-submersão, facto que demonstra o potencial deste método na estimativa do tempo de submersão *postmortem* (42).

Um estudo de Dickson *et al.* (2011) teve também como objetivo investigar os microrganismos envolvidos na decomposição, em ambiente marinho, e avaliar o potencial da sucessão bacteriana como método para estimar o ISPM (44). Esta investigação conseguiu fornecer novas informações sobre a microbiologia *postmortem* envolvida na decomposição de restos de animais, em contexto marinho (44). Verificou-se que as bactérias marinhas colonizaram rapidamente os restos de animais submersos, evidenciando um padrão sucessivo, tendo sido observadas diferenças sazonais (44). Nesta investigação, a temperatura da água provavelmente contribuiu para as diferenças observadas nas comunidades colonizadoras (44).

É importante ter em conta que certos grupos bacterianos podem possuir maior capacidade de se adaptar fisiologicamente a condições ambientais específicas, superando outros grupos (44). Assim, para a colonização e sucessão de bactérias marinhas ser utilizada como ferramenta de estimativa do ISPM, é necessária a existência de padrões sazonais de sucessão de microrganismos (44). A salinidade, os nutrientes e outros parâmetros da qualidade da água também são também fatores importantes a considerar (44).



## Conclusão

A estimativa do intervalo *postmortem* tem sido um tema de investigação nas ciências forenses. A existência de técnicas objetivas, quantitativas e precisas para a determinação do IPM, para substituir a estimativa subjetiva, revela-se importante na atualidade.

Após a morte, o corpo sofre alterações substanciais na sua composição química e física, facto que pode ser útil para fornecer uma estimativa do IPM. Esta estimativa torna-se mais precisa quando é feita mais cedo, antes dos fatores ambientais afetarem o resultado.

Quando um corpo se decompõe, a atividade microbiana e bioquímica resulta numa sequência de estadios de decomposição, que estão associados a uma sucessão microbiana reprodutível em diversos modelos animais e humanos.

Os resultados obtidos em investigações na área da microbiologia forense possuem um impacto a nível social, dado o valor dos dados microbianos como evidência física em investigações medico-legais.

Apesar dos avanços recentes na área da microbiologia forense, permanecem ainda falhas significativas no conhecimento da decomposição de cadáveres. No entanto, estudos mostraram que a vasta diversidade e as interações complexas das comunidades microbianas do solo e dos cadáveres têm grande potencial de aplicação forense, nomeadamente para estimativa do intervalo *postmortem*.

# Referências Bibliográficas

1. Hauther KA, Cobaugh KL, Jantz LM, Sparer TE, DeBruyn JM. Estimating Time Since Death from Postmortem Human Gut Microbial Communities. *Journal of forensic sciences*. 2015;60(5):1234-40.
2. Mahalakshmi V, Gururaj N, Sathya R, Sabarinath TR, Sivapathasundharam B, Kalaiselvan S. Assessment of histological changes in antemortem gingival tissues fixed at various time intervals: A method of estimation of postmortem interval. *Journal of forensic dental sciences*. 2016;8(2):114.
3. Metcalf JL, Wegener Parfrey L, Gonzalez A, Lauber CL, Knights D, Ackermann G, et al. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLife*. 2013;2:e01104.
4. Iancu L, Sahlean T, Purcarea C. Dynamics of Necrophagous Insect and Tissue Bacteria for Postmortem Interval Estimation During the Warm Season in Romania. *Journal of medical entomology*. 2016;53(1):54-66.
5. Vass AA. The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic science international*. 2011;204(1-3):34-40.
6. Javan GT, Finley SJ, Abidin Z, Mulle JG. The Thanatobiome: A Missing Piece of the Microbial Puzzle of Death. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:225.
7. Javan GT, Finley SJ, Can I, Wilkinson JE, Hanson JD, Tarone AM. Human Thanatobiome Succession and Time Since Death. *Scientific reports*. 2016;6:29598.
8. Burcham ZM, Hood JA, Pechal JL, Krausz KL, Bose JL, Schmidt CJ, et al. Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. *Forensic science international*. 2016;264:63-9.
9. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(10):908-34.
10. Dunphy MA, Weisensee KE, Mikhailova EA, Harman MK. Design and evaluation of a bioreactor with application to forensic burial environments. *Forensic science international*. 2015;257:242-51.
11. Carter DO, Metcalf JL, Bibat A, Knight R. Seasonal variation of postmortem microbial communities. *Forensic science, medicine, and pathology*. 2015;11(2):202-7.
12. Szelecz I, Fournier B, Seppey C, Amendt J, Mitchell E. Can soil testate amoebae be used for estimating the time since death? A field experiment in a deciduous forest. *Forensic science international*. 2014;236:90-8.
13. Iancu L, Carter DO, Junkins EN, Purcarea C. Using bacterial and necrophagous insect dynamics for post-mortem interval estimation during cold season: Novel case study in Romania. *Forensic science international*. 2015;254:106-17.
14. Campobasso CP, Di Vella G, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic science international*. 2001;120(1-2):18-27.
15. Yadav AB, Angadi PV, Kale AD, Yadav SK. Histological assessment of cellular changes in postmortem gingival specimens for estimation of time since death. *The Journal of forensic odonto-stomatology*. 2015;33(1):19-26.
16. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
17. Can I, Javan GT, Pozhitkov AE, Noble PA. Distinctive thanatobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *Journal of microbiological methods*. 2014;106:1-7.

18. Palmiere C, Egger C, Prod'Hom G, Greub G. Bacterial Translocation and Sample Contamination in Postmortem Microbiological Analyses. *Journal of forensic sciences*. 2016;61(2):367-74.
19. Pechal JL, Crippen TL, Benbow ME, Tarone AM, Dowd S, Tomberlin JK. The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International journal of legal medicine*. 2014;128(1):193-205.
20. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Die Naturwissenschaften*. 2007;94(1):12-24.
21. Hyde ER, Haarmann DP, Lynne AM, Bucheli SR, Petrosino JF. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PloS one*. 2013;8(10):e77733.
22. Paczkowski S, Schutz S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;91(4):917-35.
23. Finley SJ, Benbow ME, Javan GT. Microbial communities associated with human decomposition and their potential use as postmortem clocks. *International journal of legal medicine*. 2015;129(3):623-32.
24. Damann FE, Williams DE, Layton AC. Potential Use of Bacterial Community Succession in Decaying Human Bone for Estimating Postmortem Interval. *Journal of forensic sciences*. 2015;60(4):844-50.
25. Lauber CL, Metcalf JL, Keepers K, Ackermann G, Carter DO, Knight R. Vertebrate decomposition is accelerated by soil microbes. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(16):4920-9.
26. Widya M, Moffatt C, Simmons T. The formation of early stage adipocere in submerged remains: a preliminary experimental study. *Journal of forensic sciences*. 2012;57(2):328-33.
27. Finley SJ, Pechal JL, Benbow ME, Robertson BK, Javan GT. Microbial Signatures of Cadaver Gravesoil During Decomposition. *Microbial ecology*. 2016;71(3):524-9.
28. Bergmann RC, Ralebitso-Senior TK, Thompson TJ. An RNA-based analysis of changes in biodiversity indices in response to *Sus scrofa domestica* decomposition. *Forensic science international*. 2014;241:190-4.
29. Moreno LI, Mills D, Fetscher J, John-Williams K, Meadows-Jantz L, McCord B. The application of amplicon length heterogeneity PCR (LH-PCR) for monitoring the dynamics of soil microbial communities associated with cadaver decomposition. *Journal of microbiological methods*. 2011;84(3):388-93.
30. Benninger LA, Carter DO, Forbes SL. The biochemical alteration of soil beneath a decomposing carcass. *Forensic science international*. 2008;180(2-3):70-5.
31. Cobaugh KL, Schaeffer SM, DeBruyn JM. Functional and Structural Succession of Soil Microbial Communities below Decomposing Human Cadavers. *PloS one*. 2015;10(6):e0130201.
32. Metcalf JL, Xu ZZ, Weiss S, Lax S, Van Treuren W, Hyde ER, et al. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6269):158-62.
33. Chun LP, Miguel MJ, Junkins EN, Forbes SL, Carter DO. An initial investigation into the ecology of culturable aerobic postmortem bacteria. *Science & justice : journal of the Forensic Science Society*. 2015;55(6):394-401.
34. Tuomisto S, Karhunen PJ, Vuento R, Aittoniemi J, Pessi T. Evaluation of postmortem bacterial migration using culturing and real-time quantitative PCR. *Journal of forensic sciences*. 2013;58(4):910-6.
35. Hyde ER, Haarmann DP, Petrosino JF, Lynne AM, Bucheli SR. Initial insights into bacterial succession during human decomposition. *International journal of legal medicine*. 2015;129(3):661-71.

36. Heimesaat MM, Boelke S, Fischer A, Haag LM, Loddenkemper C, Kuhl AA, et al. Comprehensive postmortem analyses of intestinal microbiota changes and bacterial translocation in human flora associated mice. *PloS one*. 2012;7(7):e40758.
37. Pechal JL, Crippen TL, Tarone AM, Lewis AJ, Tomberlin JK, Benbow ME. Microbial community functional change during vertebrate carrion decomposition. *PloS one*. 2013;8(11):e79035.
38. Liu Q, Sun Q, Liu Y, Zhou L, Zheng N, Liu L. Bioluminescent assay of microbial ATP in postmortem tissues for the estimation of postmortem interval. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2009;29(6):679-83.
39. Tranchida MC, Centeno ND, Cabello MN. Soil fungi: their potential use as a forensic tool. *Journal of forensic sciences*. 2014;59(3):785-9.
40. Hawksworth DL, Wiltshire PE. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic science international*. 2011;206(1-3):1-11.
41. Schwarz P, Dannaoui E, Gehl A, Felske-Zech H, Birngruber CG, Dettmeyer RB, et al. Molecular identification of fungi found on decomposed human bodies in forensic autopsy cases. *International journal of legal medicine*. 2015;129(4):785-91.
42. Lang JM, Erb R, Pechal JL, Wallace JR, McEwan RW, Benbow ME. Microbial Biofilm Community Variation in Flowing Habitats: Potential Utility as Bioindicators of Postmortem Submersion Intervals. *Microorganisms*. 2016;4(1).
43. Benbow ME, Pechal JL, Lang JM, Erb R, Wallace JR. The Potential of High-throughput Metagenomic Sequencing of Aquatic Bacterial Communities to Estimate the Postmortem Submersion Interval. *Journal of forensic sciences*. 2015;60(6):1500-10.
44. Dickson GC, Poulter RT, Maas EW, Probert PK, Kieser JA. Marine bacterial succession as a potential indicator of postmortem submersion interval. *Forensic science international*. 2011;209(1-3):1-10.

# **ANEXOS**

## **Anexo 1**

### **Declaração de autoria do trabalho apresentado**

## DECLARAÇÃO

### Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

23/05/2017

Patrícia Nova

A investigadora

## **Anexo 2**

**Parecer do Orientador para entrega definitiva do  
trabalho apresentado**



## PARECER

(Entrega do trabalho final de Monografia)

Informo que o trabalho de Monografia desenvolvido pela Estudante Patrícia Pereira Novo com o título: "Microbiologia Forense e Estimativa do Intervalo *Postmortem*", está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

23/05/2013

A Orientadora



---

(Inês Alexandra Costa Morais Caldas)

### **Anexo 3**

**Parecer do Coorientador para entrega definitiva do  
trabalho apresentado**

## PARECER

(Entrega do trabalho final de Monografia)

Informo que o trabalho de Monografia desenvolvido pela Estudante Patrícia Pereira Novo com o título: "Microbiologia Forense e Estimativa do Intervalo *Postmortem*", está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

23 / 5 / 2017

A Coorientadora

Benedita Sampaio Maia

(Maria Benedita Almeida Garrett de Sampaio Maia Marques)